

HIV感染者の血清を用いたgp41の融合支持構造を認識する抗体の特性化

著者	服部 俊夫
URL	http://hdl.handle.net/10097/45454

HIV 感染者の血清を用いた gp41 の融合支持構造を認識する抗体の特性化

(課題番号 10670946)

平成 10 年度～平成 11 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (C) (2))

研究成果報告書

平成 12 年 3 月

研究代表者 服部俊夫
(東北大学大学院感染病態学分野 教授)

はしがき

世界では毎日約16,000人の新しいHIV-1感染者が発生している。治療法の進歩は目覚ましいものの、既に耐性ウイルスの感染を危惧する地域と、その治療の恩恵さえ受けられない地域の格差は依然広がる一方であるが、いずれにしろ感染予防が焦眉の課題である。感染の予防で最も効率的なものはワクチンの開発であるが、現在抗HIVワクチン開発も困難を極めている。その理由を明らかにして、対策を講じるには感染機構の詳細な解明が必須である。そのためには、関与するウイルス蛋白の三次元構造の解明が重要な位置を占める。

1983-4年にエイズの原因ウイルスとしてHIVが同定された直後に、細胞側受容体としてCD4分子が同定された。筆者が外側糖蛋白であるgp120の第3番目の可変領域と反応する膜蛋白をsecond receptorとして仮想して研究を進めていた頃、時々CD4分子を研究室しているのですかと邪心なく問われた経験があるほど第二の受容体はその実体が不明であった。十数年以上にわたり世界中のHIV研究者が競いあった結果、2番目の受容体はケモカイン受容体であることが明らかになった。ケモカイン-ケモカイン受容体は多様であり、結合するgp120の多様性とあいまって、研究者のロマンを誘い、好むと好まずにかかわらず、多数の研究者がこの領域に参集した。しかしながら、ligandと受容体が多様であることは、かなりの曖昧性を利用した生命現象であり、この系を利用した特異的な感染阻止物質が臨床でどの程度の成績を上げるかを疑問視する向きもある。その様な事実を踏まえここではgp120が受容体に結合した後に生ずるウイルスと細胞膜の融合の最終段階にかかわり立体構造変化するgp41に対する液性免疫応答を検討し、その抑制の可能性について述べる。

東北大学図書



00010177330

附属図書館

研究組織

研究代表者：服部俊夫（東北大学大学院感染病態学）

研究協力者：谷口裕子、張曉燕、徐又農

研究経費

平成10年度	1,700	千円
平成11年度	1,500	千円
計	3,200	千円

研究発表

ア；学会雑誌

1. Sakaida, H., T. Hori, A. Yonezawa, A. Sato, Y. Isaka, O. Yoshie, T. Hattori, and T. Uchiyama. T-tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-derived V3 loop peptides directly bind to CXCR-4 and inhibit T-tropic HIV-1 infection. *J Virol* **72** (12 1998): 9763-9770.
2. Zhang, X., Iwatani, Y., Shimayama, T., Yamada, R., Koito, A., Xu, Y., Sakai, H., Uchiyama, T. and Hattori, T. : Phosphorothioate hammerhead ribozymes targeting a conserved sequence in V3 loop region inhibit HIV-1 entry. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*. **8** (6), 441-450, 1998.
3. Hattori, T., Komoda, H., Pahwa, s., Tateyama, M., Zhang, X., Xu, Y., Oguma, S., Fukutake, K. and Uchiyama, T.: A delinea of anti-DP107 antibody associates with clinical progress. *AIDS*. **12** (12) 1557-1559, 1998.
4. Xu, Y., Tamamura, H., Arakaki, R., Nakashima, H., Zhang, X., Fujii, N., Uchiyama, T., and Hattori, T.: An enhancement in the binding ability of tachyplesin analogues to CXCR4 brought out a marked increase in anti-HIV activity as well as inhibitory activity against HIV entry mediated by CXCR4. *AIDS-Res-Hum-Retroviruses*. **15** (5), March 20, 1999.
5. Zhang, X., Xu, Y., Hong, L, Hattroi, T. Inhibition of infection of

incoming HIV-1 virus by RNA-cleaving DNA enzyme. FEBS Letters
458 (2): 151-156, 1999

イ；口頭発表

1. Hattori T., Komoda H, Pahwa S, Tateyama M, Zhang X, Xu Y, Uchiyama T. Natural antibody responses against two distinct _-helical regions in gp41. US-Japan Cooperative Medical Science Program, Hyatt Regency Suites, Palm Springs CA, March 18-20, 1998 Williamburgs, VA.
2. Hattori T, and Zolla-Pazner S. HIV-1 gp41の活性化融合構造に対する液性抗体反応。第28回 日本免疫学会 シンポジウム6 エイズ 神戸、1998年12月2-4日。
3. 徐又農、張曉燕、内山卓、服部俊夫：HIV の gp41由来のペプチドの構造と感染抑制機構。第28回日本免疫学会総会、国際免疫シンポジウム、神戸、1998年11月30-12月6日。
4. 徐又農、張曉燕、内山卓、服部俊夫：HIV の膜貫通タンパク gp41 由来のペプチドの抑制機構の検討。第46回日本ウイルス学会総会、東京、1998年10月12-14日。
5. Hattori T, Taniguchi Y, Xu Y, Zhang X, Takeda S, Zolla-Pazner S. Characterization of a human monoclonal antibody (98.6) that reacts with the conformational epitope of N36/C34 of gp41. US-Japan Cooperative Medical Science Program, March 23-27 Toyama, Japan 1999
6. 谷口裕子、武田哲、薦田温子、徐又農、張曉燕、服部俊夫：HIV-1 gp41 の活性化融合殻構造に対する抗体の特性。第12回日本エイズ学会 東京、1998年12月1-2日。
7. Hattori T, Taniguchi Y, Xu Y, Takeda S, Zhang X, Ohno I, Zolla-Pazner S. A human monoclonal antibody (98-6) reacts with the fusion active form of gp41 Cold Spring Harbor Laboratory Sept. 22-26, 1999
8. 服部俊夫、谷口裕子、武田哲、徐又農、張曉燕、松岡雅雄 融合殻構造を認識する98-6抗体の種々のウイルス膜抗原への反応 第47回 日本ウイルス学会 横浜 1999年 11月7-9日
9. Hattori T, Zolla-Pazner S. Human monoclonal antibodies against fusion active core structure. 5th Asia-Pacific rim conference on infectious diseases Jan 7-10, Chennai, India, 2000

HIV 感染者の血清を用いた gp41 の融合支持構造を認識する抗体の特性化

服部俊夫

(東北大学大学院医学系研究科 内科病態学講座 感染病態学分野 教授)

研究目的

HIV の env は細胞膜受容体への結合を担う gp120 と融合を担う膜貫通糖蛋白(gp41)よりなる。(図1) gp41 aa 644-663 のウイルス外ドメインには二つアルファヘリックス領域が存在し、当該ペプチドは融合を低濃度で抑制することが知られていた。研究者らは HIV-1 に感染している小児患者 20 名について平均 24.5 ヶ月の期間を置いて採取された 3 回の血清中の DP107 に対する抗体の陽性率は time1 では 85%、time2 では 80%、time3 では 70%であった。また、抗 DP107 抗体価の平均値は time1 から 2 で 39%、time2 から 3 でさらに 37%の低下した (time1 から 3 では約 60%)。DP107 は α -ヘリックス構造を示すので、その抗体の低下が、活性化融合殻構造 (fusion active core) に対する抗体の低下と関連している可能性を抗体の作製を試みた。またこの抗体の低下が活性化融合殻構造 (fusion active core) に対する抗体の低下と関連している可能性を検索するために、本構造に対する抗体の特性について検討を加えた。

研究方法

当該領域の研究で以前より融合阻止活性が強いことが知られている DP107: aa 553-590 と DP178: aa 638-673 及び近年結晶化された活性化融合殻構造を構成する N36: aa

546-580 と C34: aa 628-661 と呼ばれるペプチドを合成した。(図 2) これらのペプチド単独とこれらのペプチドの混合物の円偏光二色性(CD)解析を行った。(図 3)

N36 および C34 の複合体を作製し、兎の背中の皮下または皮内に FCA とともに免疫し、抗血清を得た。得られた Immune sera を用い、N36、C34 および複合体を plate に coating し、anti N36 抗体、anti C34 抗体の 3 種類の抗体を用いて ELISA を行った。また IIIB 感染 H9 細胞株に soluble CD4 を反応させ、その前後で抗体の反応性を確認した。H9/IIIB を sCD4 で 5 分、または 30 分処理したあと細胞表面ビオチン化し、lysate を作って Immune sera で免疫沈降を行った。次にこれらのペプチド単独あるいはその複合体を ELISA plate に coating し、種々の抗体で反応性を確認した。主に解析に使用したのはヒト型モノクロナル抗体 98.6 と 50-69 抗体で、前者の認識するエピトープは立体構造であるが、aa 644-663 を含む領域を認識する。また gp41 の linear epitope aa 727-732 を認識する Chessie 8 や V3 を認識する C β 1 をコントロールとして用いた。これらの抗体を用い精製したウイルスと HTLV-IIIB 感染 H9 細胞溶解液を用いた Western blot を行った。H9/IIIB を sCD4 で 5 分、または 30 分処理したあと細胞表面ビオチン化した後に溶解液を作ってこれらの抗体で免疫沈降を行った。

研究成果

円偏光二色性解析

DP107 は 208 と 222nm にピークを有する典型的な α -ヘリックス構造を示した。一方、DP178 はランダム構造をしており、この 2 つのペプチドを生理条件下で混合すると、DP107 の α -ヘリックス構造が消失した。これらより、二つのペプチドは相互的に反応するが、活性化融合殻としての構造をとらないことが明らかになった。

そこで、結晶化に用いられた N36 と C34 を用いて同様の解析を行ったところ、これら二つのペプチドは単独ではランダム構造であったが、複合体は強い α -ヘリックス構造を検

出できた。これらより N36 と C34 を混合することにより活性化融合殻構造を mimic できる構造が出現すると思われる。(図 3)

ELISA

Anti N36、C34 抗体はそれぞれ N36、C34 と強く反応した。得られた immune serum は N36/C34 複合体にも同様に強く反応した。また 98-6 抗体は DP107/DP178 混合物とは余り強く反応しなかったが、N36/C34 混合物に対しては、C34 単独よりも強く反応するようになった。(図 4)

Flow cytometer

98-6 は研究者らが最近活性化融合殻構造を認識するヒト型モノクロナル抗体であることを明らかにした。59-6 は異なる領域の立体構造を認識する抗体である。sCD4 を添加した後、2 時間後の細胞膜表面を観察すると V3 loop の発現はむしろ低下し、50-69 と 98-6 発現の蛍光強度は著明に増強して、機能分子を認識する抗体であることが明らかになった。同じく sCD4 で処理した H9/IIIB を Immune sera で染色し、FACSscan で解析した。pre immune serum は sCD4 処理前後で染色性に変化がなかった。Immune serum では sCD4 無添加でも若干染色されたが、添加によって蛍光強度が有意に増加した。

免疫沈降

H9/IIIB を sCD4 で 5 分、または 30 分処理したあと細胞膜表面をビオチン化し、Immune serum で免疫沈降した結果から、Immune serum では sCD4 処理の時間が長くなると 120kD 付近の 3 量体に相当するバンドが強くなるのが確認された。

考案

治療の進歩により HIV 感染の病態の改善は望まれるようになった。しかしながら感染者

数の増加は世界的規模で続いている。感染阻止を目指したワクチン開発の抗原は従来は gp120 に集中して研究が進められてきた。しかしながら、この抗原により誘導されている抗体には残念ながら患者の野生株を中和できる十分な抗体を誘導しない。一方で gp41 の細胞外領域が結晶化されるにおよび融合の最終局面に関与する gp41 の役割が益々クローズアップされてきた。ここでは合成ペプチドを用い、活性化融合殻構造を作製して、抗体作製を試みた。最近ではより立体構造を認識する可能性の高い、融合している細胞をフォルマリン固定して、免疫する方法が有効であると報告されている。今後様々な方法で融合に伴う立体構造変化を認識できる抗体の作製を試みる予定である。

1. gp120の細胞膜受容体への結合
2. gp120の立体構造変化と遊離

3. gp41の立体構造変化により融合ペプチドの出現
4. ウイルスと細胞膜の融合

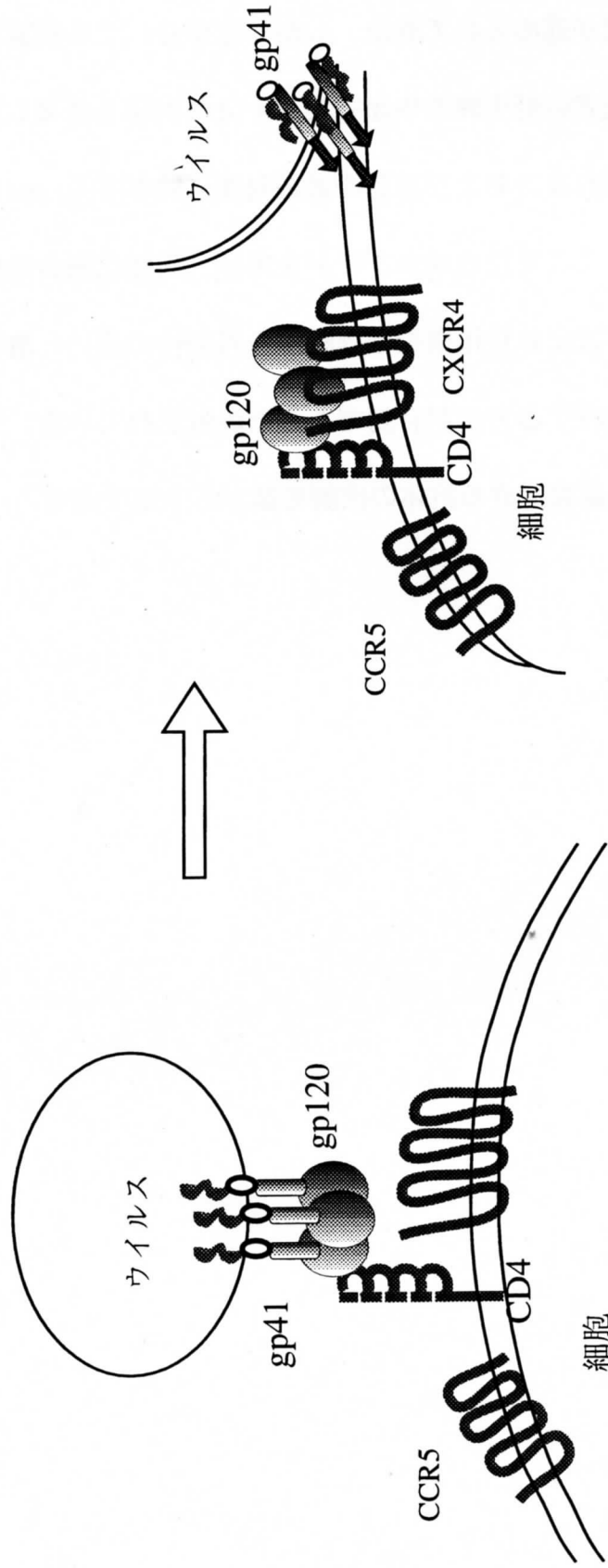


図1 HIV感染にかかわるウイルス分子と細胞膜受容体

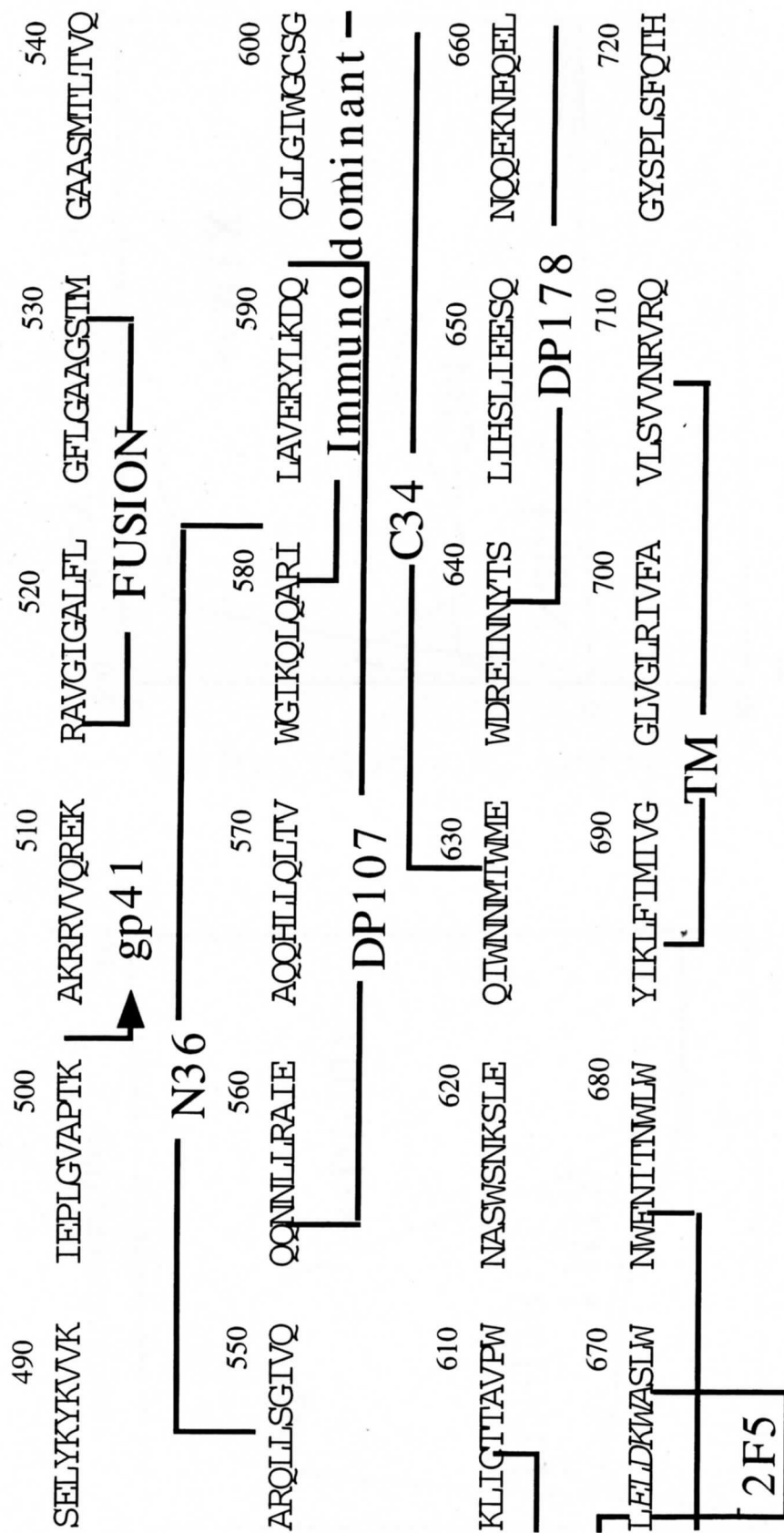


図2 gp41の機能領域

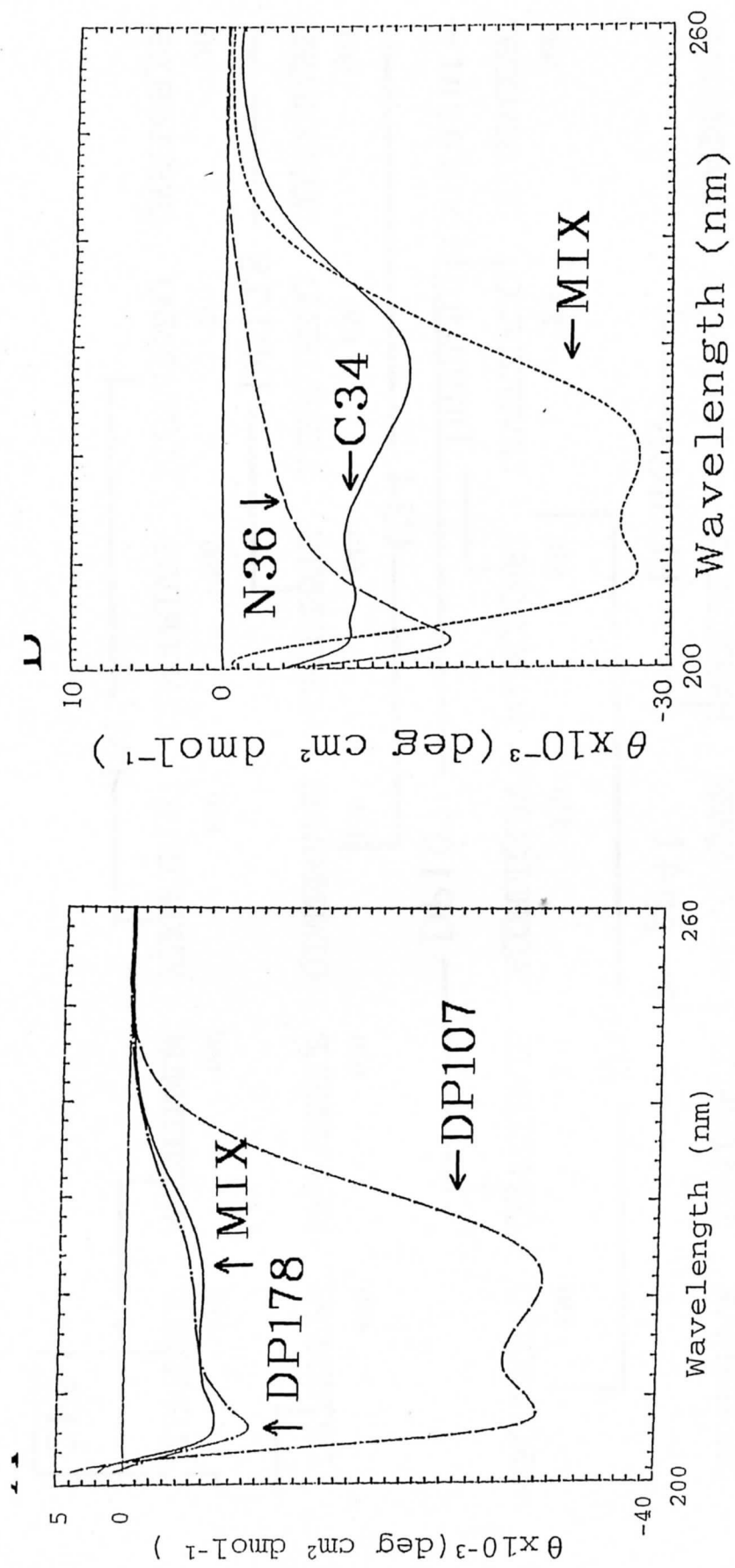
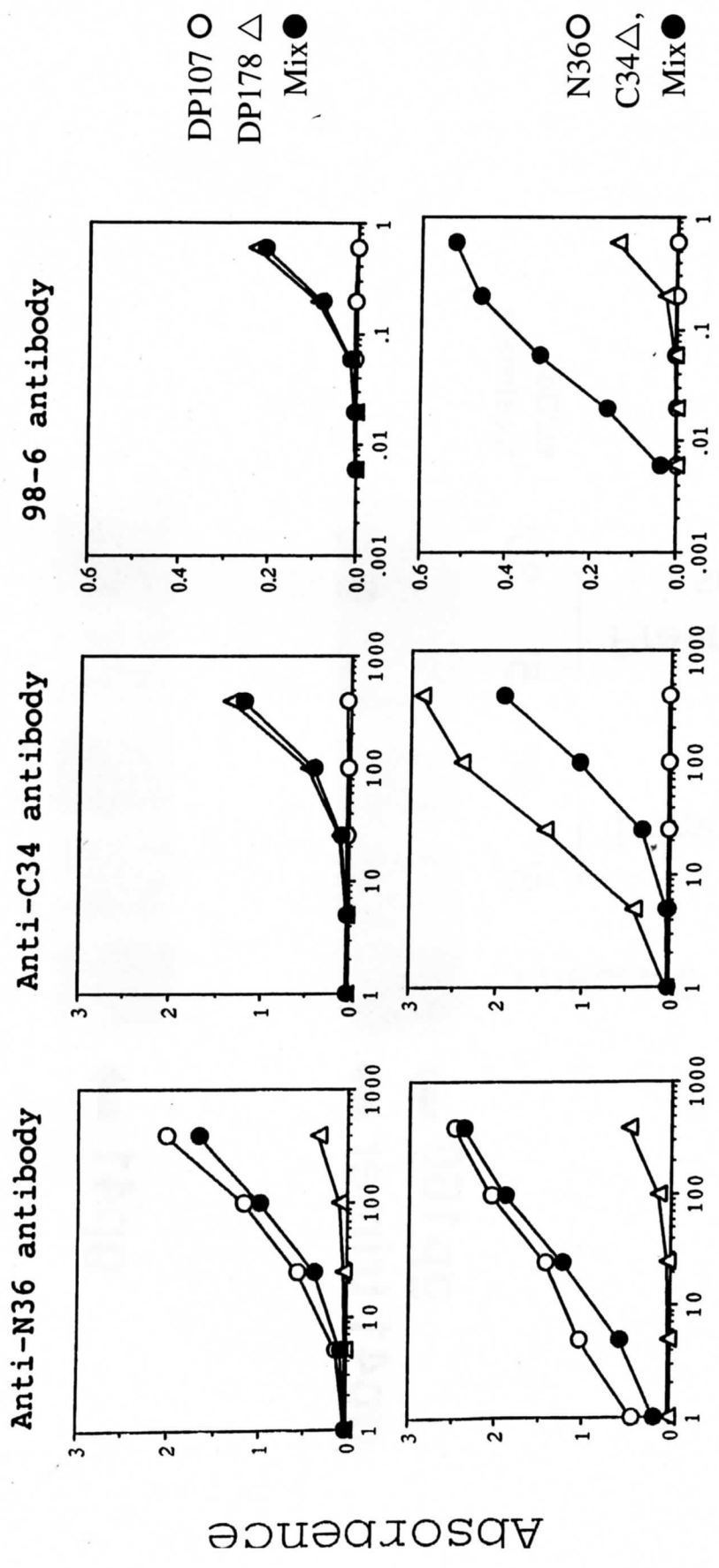


図3 gp41 由来ペプチドのCD解析



Concentrations of antibodies (μg/ml)

図4 各種抗体のペプチド単独あるいは混合物との反応

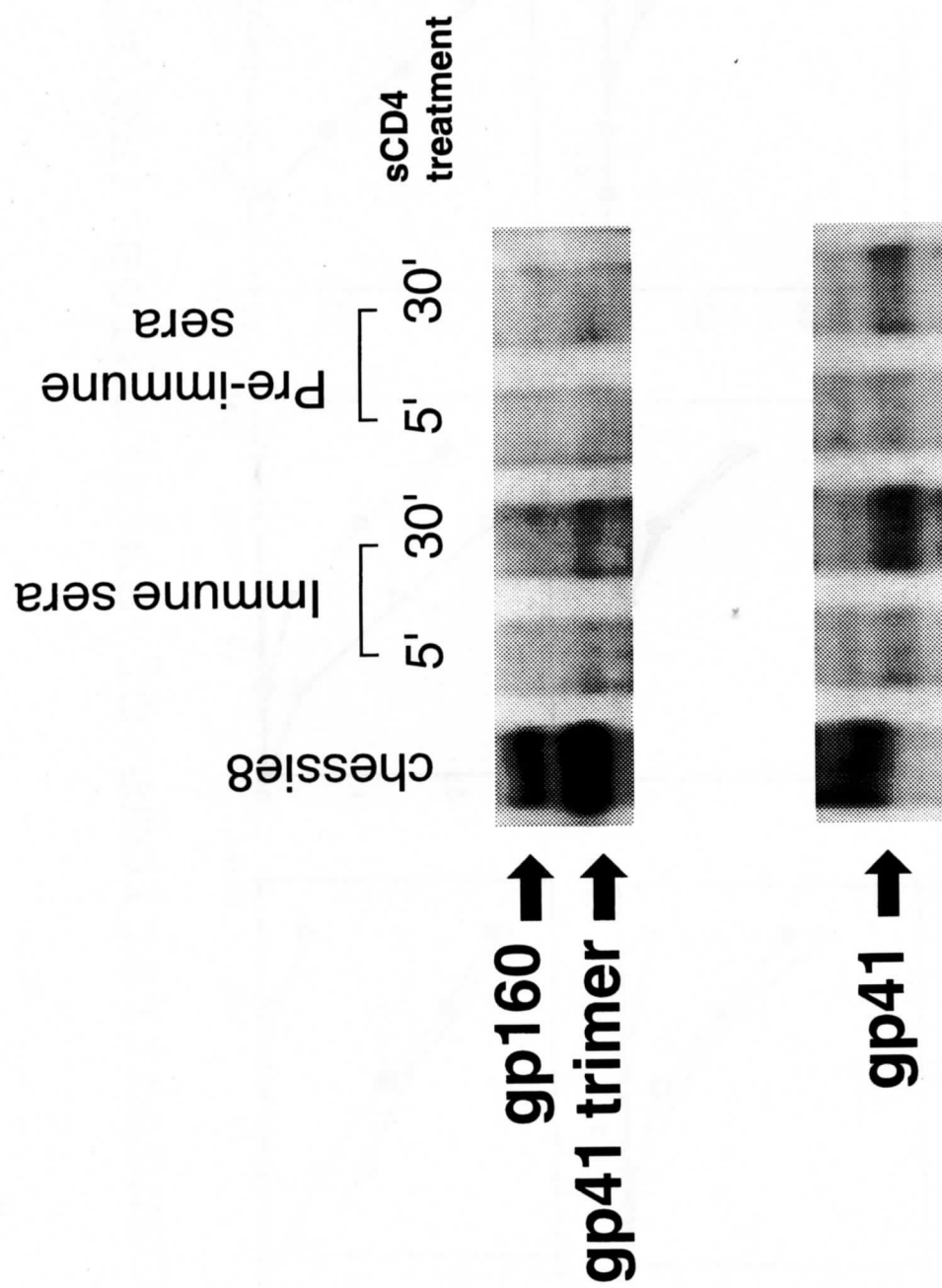


図5 家兔血清による HIV感染細胞の免疫沈降

本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録しておりません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。